

Lungfibros hos hund

*Fallbeskrivningar, histopatologi samt analys
av surfaktantproteiner*

Maria Eriksson

Handledare: Jan Johansson
Inst. för anatomi, fysiologi & biokemi

Biträdande handledare:
Henrik von Euler & Jens Häggström
Inst. för kliniska vetenskaper

Elisabet Ekman
Inst. för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning.....	4
Summary in English	4
Förkortningar	5
Inledning.....	5
Litteraturoversikt	6
Respirationsorganens fysiologi och anatomi	6
Respirationsepitellets svar på skada.....	6
Lungsurfaktant	6
Klassificering av pneumonier	9
Idiopatiska interstitiella pneumonier (IIP)	10
Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) hos människa.....	11
Familiär sjukdom	12
Sporadisk sjukdom.....	13
Murina sjukdomsmodeller	13
Patogenes – möjliga molekylära mekanismer	13
Lungfibros hos hund	14
Klinisk fenotyp	14
Datortomografi.....	15
Histopatologiska kännetecken	16
Material och metoder	17
Patologi	18
Bronkoalveoärt lavage (BAL)	18
Western Blot	18
Sekvensering av proSP-C genen.....	19
Resultat	19
Anamnes och klinisk presentation	19
Fall A	19
Fall B.....	19
Fall C.....	20
Fall D	20
Fall E.....	20
Histopatologiska fynd	20
Fall A	21
Fall B.....	21
Fall C.....	21
Fall D	21
Fall E.....	21
Western blot och surfaktantanalys	24
Diskussion.....	25
Litteraturförteckning	29
Tack -- Acknowledgement	32

SAMMANFATTNING

Lungfibros, eller idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) är en kronisk lungsjukdom som drabbar människa med en uppskattad incidens av 3-6 fall per 100 000 invånare i Sverige. Inget botemedel finns mot sjukdomen som i samtliga fall leder till döden. En liknande sjukdom har noterats hos terrierhundar med allra högst prevalens hos rasen West Highland White Terrier (WHWT). Hundar med lungfibros blir tröttare än vanligt och ovilliga att leka eller gå på promenad. Ibland utvecklar de också hosta och uttalade respiratoriska problem. Detta arbete ger en översiktlig sammanfattning av området lungfibros samt beskriver en metod för att analysera surfaktantproteiner i bronkoalveolärt lavage (BAL) hos hund. Fem fall av lungfibros hos hund presenteras med kliniska fynd, histopatologi samt surfaktantanalys. Resultaten visar att en av hundarna med lungfibros saknar detekterbart surfaktant protein C (SP-C) i postmortalt BAL, något som också påvisats hos människor med en familjär form av IPF.

SUMMARY IN ENGLISH

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a chronic respiratory disease with an estimated incidence of 3-6 cases per 100 000 inhabitants in Sweden. There is no cure for the disease, which inevitably leads to death. A similar disease has been found among terrier dogs, with an especially high prevalence in the West Highland White Terrier (WHWT). Dogs with pulmonary fibrosis become lethargic with exercise intolerance, and in some cases they develop cough and respiratory distress. This thesis gives a brief review of the field of pulmonary fibrosis and presents a method for analyzing surfactant proteins in bronchoalveolar lavage (BAL) in the dog. Five cases of canine pulmonary fibrosis are presented with clinical data, histopathology and surfactant analysis. The results show that one of the dogs with pulmonary fibrosis lacks detectable surfactant protein C (SP-C) levels in BAL, which also has been shown in humans diagnosed with a familial form of IPF.

FÖRKORTNINGAR

BAL	Bronkoalveolärt lavage
CFA	Cryptogenic fibrosing alveolitis
CT-scanning	Datortomografi
DAD	Diffuse alveolar damage
DIP	Desquamative interstitial pneumonia
ER	Endoplasmatiskt retikulum
IFA	Idiopatisk fibroserande alveolit
IIP	Idiopatiska interstitiella pneumonier
ILD-RB	Respiratory bronchiolitis interstitial lung disease
IPF	Idiopathic pulmonary fibrosis
LIP	Lymphoid interstitial pneumonia
NSIP	Nonspecific interstitial pneumonia
OP	Organizing pneumonia
PAS	Periodic Acid Schiff
ProSP-C	Surfaktantprotein C prekursorprotein
SP-A	Surfaktantprotein A
SP-B	Surfaktantprotein B
SP-C	Surfaktantprotein C
SP-D	Surfaktantprotein D
UIP	Usual interstitial pneumonia

INLEDNING

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) är en dödlig sjukdom som drabbar människor med en uppskattad incidens av 3-6 fall per 100 000 invånare i Sverige. Troligen är dock sjukdomen underdiagnostiserad (Sköld 2007). Som namnet antyder är etiologin okänd, men drabbade människor får en kraftig bindvävsinlagring i lungorna och därmed respiratoriska problem. IPF går inte att bota, och en drabbad patients enda hopp är lungtransplantation, vilket kan fördröja sjukdomens förlopp några år (Costabel & King 2001). Idag begränsar antalet donerade organ möjliga lungtransplantationer för patienter med lungfibros. Enligt Socialstyrelsen dör varje år ca 300 personer i Sverige av sjukdomen. Denna siffra motsvarar ungefär dödligheten i motorfordonsolyckor på allmän väg, vilken var 328 stycken under 2004 (Socialstyrelsen 2007). Trots att lungfibros har dödlig utgång för så många människor uppmärksammas den väldigt lite och få känner till sjukdomen. Amerikanska studier visar att interstitiell lungfibros har ökat de senaste åren, framför allt hos kvinnor (Olson et al 2007).

Interstitiell lungfibros liknande den hos människa finns också beskriven hos hundar, med högst prevalens hos rasen West Highland White Terrier. Liknande sjukdomar med fibros har också iakttagits hos katter (Cohn et al 2004, Williams et al 2004) och hästar (Caswell & Williams 2007).

Syftet med detta arbete är att ge en litteraturöversikt av ämnet lungfibros ur ett vidare perspektiv samt undersöka huruvida lungfibros hos hund uppvisar förändringar som liknar IPF hos människa. Arbetet inkluderar också fallstudier på

hund inkluderande histopatologisk undersökning av lungor samt analys av surfaktantproteiner i bronkoalveolärt lavage (BAL).

LITTERATURÖVERSIKT

Respirationsorganens fysiologi och anatomi

Respirationsorganen delas generellt upp i övre och nedre luftvägar. Övre luftvägarna sträcker sig från nosspegeln och ned till larynx. De nedre luftvägarna består av trakea, bronker, bronkioler, alveolgångar och alveoler. Alveolerna utlinjeras av två huvudsakliga typer av celler, typ I och typ II pneumocyter.

Typ I pneumocyterna är stora platta epitelceller som utgör ca 93 % av alveolernas yta (Caswell & Williams 2007). De är maximalt differentierade celler och har därför ingen möjlighet att regenerera ifall alveolarepitelet skadas. På grund av sin stora membranyta och låga halt antioxidanter är de känsliga för oxidativ stress. Vid irreversibel skada på typ I cellerna stöts de bort från basalmembranet och regeneration sker via typ II celler.

Typ II pneumocyterna är kubiska epitelceller och utgör resterande ca 7 % av respirationsepitelet. Deras huvudfunktion är att fungera som stamceller för regeneration och reparation av respirationsepitelet samt att metabolisera xenobiotika (kroppsfämmande ämnen). Typ II pneumocyterna producerar också surfaktant som lagras i lamellärkroppar i cytoplasman.

Respirationsepitelets svar på skada

Så länge skador på alveolerna är milda och övergående, eller de normala försvarsmekanismerna inte sätts ur spel, så kan lesioner i lungan läka snabbt. En okomplicerad skada på parenkymet repareras normalt inom loppet av en vecka. När alveolerna däremot utsätts för större skador eller upprepade påfrestningar klarar typ II cellerna inte av att reparera skadorna. Då har den alveolära kapaciteten för regeneration överskridits och lesionerna leder till irreversibla förändringar i alveolernas struktur med fibros som följd (McGavin & Zachary 2006).

Fibrosen bildas genom att alveolära makrofager och andra mononukleära celler i den kroniska inflammationshärden utsöndrar tillväxtfaktorer och fibronektin vilket gör att fibroblaster rekryteras och prolifererar. Dessa fibroblaster syntetiserar i sin tur stora mängder extracellulär matrix bestående av bland annat kollagen, elastiska fibrer och proteoglykaner. Den interstitiella vävnadsökningen leder till förtjockade väggar i alveolerna och sämre förutsättningar för diffusion av gaser över lungepitelet.

Lungsurfaktant

Surfaktant är en komplex blandning av fosfolipider och små mängder protein som lagras i intracellulära vesikler, så kallade lamellärkroppar. Lamellärkropparna

secernerar sedan ut i alveolerna med sitt innehåll av surfaktant. (Whitsett & Weaver 2002). Den viktigaste funktionen för surfaktant är att minska ytspänningen i alveolerna vid maximal expiration och därmed undvika att alveolerna kollapsar på grund av små luftvolym och stor epitelyta. Utan lungsurfaktant är det fysiologiskt omöjligt att andas, men även för stor mängd kan orsaka respirationsproblem. Majoriteten av surfaktantproteinerna återanvänds av lungepitelet medan de alveolära makrofagerna bryter ned resterande del.

Lungsurfaktant innehåller fyra olika specifika proteiner: surfaktant protein A (SP-A), SP-B, SP-C och SP-D. Deras strukturer och biologiska egenskaper har stor diversitet, men gemensamt är att de produceras av lungepitelets typ II celler.

SP-A och SP-D är stora glykoproteiner som främst är involverade i lungans immunförsvär, medan SP-B och SP-C huvudsakligen är ansvariga för de ytspänningsnedsättande egenskaperna. Surfaktantbrist kan förekomma hos prematura barn och kan leda till respiratory distress syndrome (RDS). Dessa barn behandlas framgångsrikt med en kombination av fosfolipider och SP-B samt SP-C, vilka utvinns från djurlungor (Palmlblad et al 1999).

SP-B är ett relativt litet (~ 9 kDa) protein som framför allt förekommer som dimer ute i alveolerna. Dess positivt laddade regioner binder troligen till fosfolipidernas hydrofila huvuden vilket förankrar SP-B mot fosfolipidfilmen. En viktig egenskap hos SP-B är dess förmåga att förena lipidsvesikler i surfaktant så att de bildar en täckande film på lungepitelet (Whitsett & Weaver 2002). Individer som saknar funktionellt SP-B, till exempel på grund av en mutation, får grava respiratoriska problem omgående efter födseln. Detta allvarliga sjukdomstillstånd liknar RDS men kan inte botas med tillskott av konstgjord surfaktant utan kräver lungtransplantation (Hamvas et al 1997).

SP-C är det till storleken minsta (~ 4 kDa) av surfaktantproteinerna, men besitter flera intressanta egenskaper som gör det biologiskt unikt. SP-C är ett av de mest hydrofoba proteiner vi känner till och består till största delen av en transmembran hydrofob α -helix (position 9-34). Proteinet har även två fettsyror (palmitinsyra) bundna till cysteiner nära N-terminalen (position 5 och 6). Avseende elektrostatisk laddning fungerar SP-C som en dipol med en positivt laddad N-terminal och negativt laddad C-terminal. SP-C är väldigt välkonserverat mellan arter och få skillnader finns mellan hund och människa (Johansson et al 1991). SP-Cs funktioner är delvis överlappande med de som tillskrivs SP-B, även om den strukturella skillnaden och dess förankring till fosfolipidmembran indikerar att de rimligen borde ha olika funktion (Palmlblad 2001).

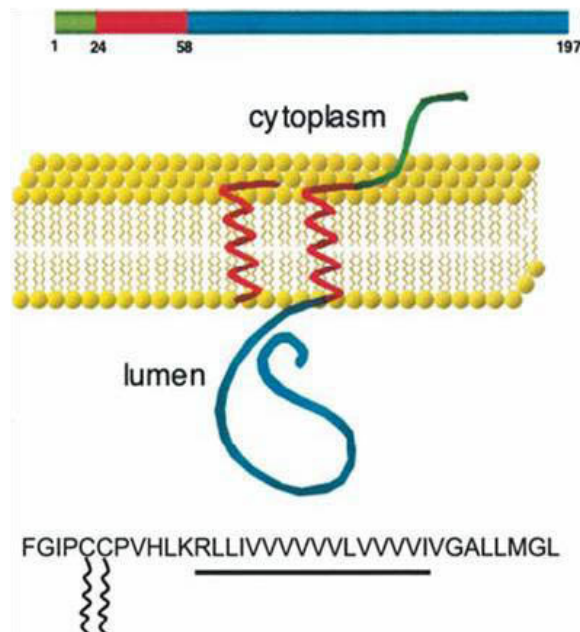
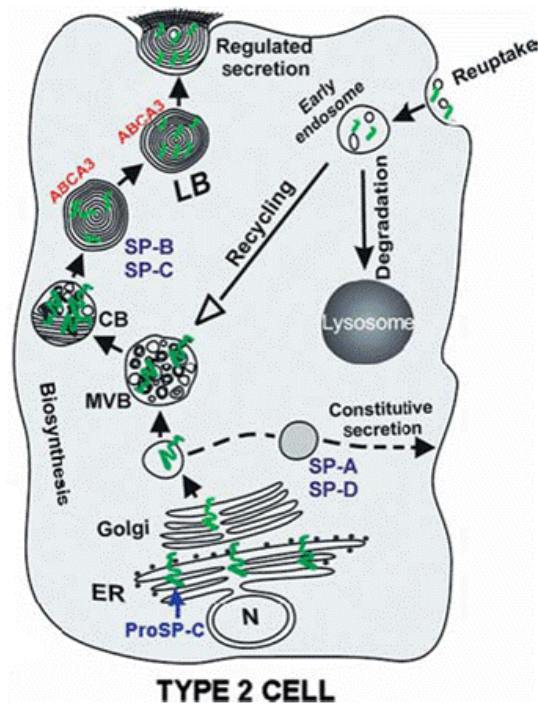


Fig 1. ProSP-C. Överst ses N-terminal (grön), moget SP-C (röd) samt C-terminal (blå) del av proSP-C. I mitten en schematisk skiss över proSP-C (höger) respektive moget SP-C (vänster) i ett fosfolipidmembran. Palmitoylgrupperna är ej inritade. Nedersta delen visar aminosyrasekvensen i det mogna proteinet med dubbel palmitoylering av cysteiner (C). Figur: Johansson et al 2004.

Som för många andra proteiner börjar syntesen av SP-C med ett prekursorprotein, proSP-C (fig 1). ProSP-Cs primärstruktur hos bland annat hund och människa består av 197 aminosyror. Den N-terminala domänen av proproteinet är den som ansvarar för att proteinet transporteras rätt inuti cellen (Nogee 2002). ProSP-C modifieras huvudsakligen i fyra steg vid transport genom cellorganellerna. Processerna är integration i endoplasmatiska retiklet (ER), palmitoylering (palmitinsyra kopplas på cysteiner) samt bortklyvning av de N- och C-terminala delarna (Beers & Mulugeta 2005). Detta resulterar i ett 35 aminosyror långt moget protein som lagras i lamellärkropparna redo att secernerats till alveolerna (fig 2).

Både SP-B och SP-C har förmågan att ändra sin sekundära struktur utifrån vilken miljö de befinner sig i. SP-C är i sin naturligt fettrika miljö en monomer med konformationen av en α -helix, men proteinet har visat sig kunna bilda fibriller bland annat i vattenlösningar (Johansson et al 2004) och hos patienter med lungsjukdomen pulmonary alveolar proteinosis (PAP) (Gustafsson et al 1999). Fibriller är en morfologisk term som beskriver en irreversibel ihopklumpning av flera β -lakan till större proteinaggregat. Bildande av extracellulära fibriller, amyloid, är idag en känd sjukdomsmekanism hos flertalet sjukdomar, till exempel Alzheimers sjukdom, galna kosjukan (BSE) och Creutzfeldts-Jacobs sjukdom (Dobson 2001).

Ytterligare en anledning till intresse för just SP-C är att en familjär form av IPF hos människa orsakas av olika mutationer i genen som kodar för proSP-C (*SFTPC*). Dessa mutationer har visat sig ge interstitiella pneumonier med varierande grad av fibros. Se vidare under rubriken "Familjär sjukdom" nedan.



TYPE 2 CELL

Fig 2. Schematisk bild över surfaktantmetabolismen i typ II pneumocyter. Biosyntes av SP-C börjar med translation i cytoplasman varpå propeptiden integreras i och passerar ER samt sorteras i Golgi. Den transporteras sedan med transportvesikler till multivesikulärkroppar (MVB), omogna lamellärkroppar (CB) och lamellärkroppar (LB) där klyvningen av prekursorproteinet blir helt färdig. Figur: Beers & Mulugeta 2005.

Klassificering av pneumonier

Lunginflammationer kan delas in på många olika sätt, bland annat i fyra morfologisk distinkta typer. Denna indelning består av bronkopneumoni, interstitiell pneumoni, embolisk pneumoni samt granulomatös pneumoni (McGavin & Zachary 2006). Den histopatologiska diagnosen vid pneumoni är ofta en kombination av dessa olika typer av lunginflammationer, vilka kan förekomma samtidigt i en lunga. Lungfibros hör till gruppen interstitiella pneumonier vilken beskrivs nedan.

Klassifikation av interstitiella lunginflammationer är, och har alltid varit, ett komplicerat ämne inom så väl veterinär som human histopatologi. För ett stort antal av dessa interstitiella sjukdomar är etiologin okänd och de betecknas med ett gemensamt namn idiopatiska interstitiella pneumonier. American Thoracic Society (ATS) och European Respiratory Society skapade ett konsensusdokument med kriterier för klassifikation av idiopatiska interstitiella pneumonier 2002. Sedan dess har dokumentet implementerats i humanmedicinen och används som grund vid diagnostisering av patienter. Inom veterinärmedicinen finns ingen konsensus rörande kriterier för olika pneumonidiagnoser trots ett uttalat behov inom ett komplext område. Nedan beskrivs kort de idiopatiska interstitiella pneumonierna hos människa som de föreslagits av ATS.

Idiopatiska interstitiella pneumonier (IIP)

Idiopatiska interstitiella pneumonier (IIP) definieras av ATS som ”en heterogen grupp med icke-neoplastiska sjukdomar resulterande från en skada av lungparenkymet med varierande inslag av inflammation och fibros” (American Thoracic Society 2002). Klassificeringen av IIP bygger främst på histopatologiska mönster eftersom de har visat sig vara mest specifika. För att komma fram till patientens slutliga diagnos krävs dock att radiologiska och kliniska fynd vägs in i bilden. En patolog bör således bara uttala sig i termer av ”mönster” och inte diagnoser. Det histopatologiska mönster som ses vid den kliniska diagnosen IPF kallas usual interstitial pneumonia (UIP).

Eftersom ett UIP-mönster är ett histologiskt kriterium för diagnosen idiopatisk lungfibros (IPF) beskrivs det mera utförligt nedan. För övriga förekommande histologiska mönster vid IIP se tabell 1.

UIP karaktäriseras histologiskt av följande punkter (American Thoracic Society 2002):

- En *multifokal utbredning* av förändringarna, normal lunga varvad med patologisk lunga. Förändringarna oftast mest uttalade *subpleuralt* och *perifert*.
- *Fibros* och förlorad struktur av alveolerna – ses vid grava fall tillsammans med *bikakebildning* (honeycombing). Bikakebildning är flera större luftfyllda cystor med tjock vägg som ligger bredvid varandra. De kan ses på konventionell röntgen, med datortomografi (CT-scanning) och histologiskt. Även *foci med fibroblaster* kan ses i utkanten av de fibrotiska områdena (se bild 3).
- *Myofibroblaster* – hyperplasi av glatt muskulatur i områden med fibros.
- *Lindrig till måttlig inflammation* med infiltrat av framför allt lymfocyter och plasmaceller.
- *Hyperplasi av typ II celler*, ibland associerat med ett ökat antal histiocyter.
- Avsaknad av tydlig kronisk inflammation, granulom och plack från inhalerade partiklar (pneumonokonios) samt ingen eosinofili är också tecken som styrker diagnosen.

Tabell 1. Histopatologisk och klinisk klassifikation av idiopatiska interstitiella pneumonier (American Thoracic Society, 2002)

Histologiskt mönster	Förkortning	Sammanvägd diagnos
Usual interstitial pneumonia	UIP	IPF
Nonspecific interstitial pneumonia	NSIP	Nonspecific interstitial pneumonia
Organizing pneumonia	OP	Cryptogenic organizing pneumonia
Diffuse alveolar damage	DAD	Acute interstitial pneumonia
Respiratory bronchiolitis	ILD-RB	Respiratory bronchiolitis interstitial lung disease
Desquamative interstitial pneumonia	DIP	Desquamative interstitial pneumonia
Lymphoid interstitial pneumonia	LIP	Lymphoid interstitial pneumonia

Histopatologiska skillnader mellan olika IIP diagnoser är små för det otränade ögat. I stycket nedan pekas i korthet på de mest uppenbara skillnaderna och kännetecknen för de olika diagnoserna. De två mest likartade diagnoserna är UIP och NSIP. Det som huvudsakligen skiljer NSIP från UIP är distributionen i lungvävnaden. NSIP är jämnt fördelat över hela lungfältet och vanligen är graden av inflammation högre. Vid OP ses framför allt en inflammation kring bronkernas och bronkiolernas interstitium medan DAD karaktäriseras av en mer diffus fibros samt hyalina membran. DIP och ILD-RB uppvisar ett jämnare fibrosmönster med peribronkiolär utbredning samt ett stort antal makrofager innehållande olika pigment. (Gross & Hunninghake 2001)

IIP är ovanligt, men av de förekommande är UIP (kopplat till IPF) den vanligaste diagnosen (Coultais et al 1994). Att kunna skilja UIP från andra idiopatiska interstitiella pneumonier är prognostiskt viktigt, eftersom ett UIP-mönster innebär mycket dålig prognos. Datortomografi eller lungbiopsi är det enskilt viktigaste verktyget för detta ändamål hos människor med interstitiell lungsjukdom (Costabel & King 2001, Gross & Hunninghake 2001).

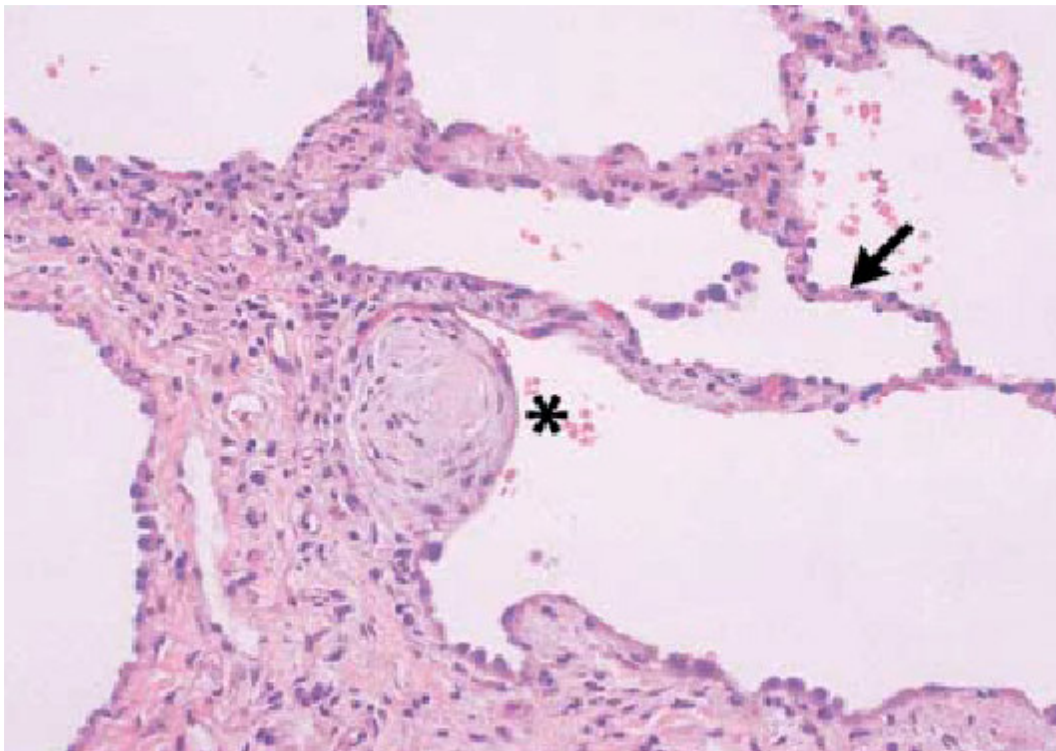


Fig 3. Histopatologisk bild av UIP hos människa. Asterisken markerar ett sk fibroblast-focus och pilen indikerar närheten till nästan normala alveoler. Bild: Gross & Hunninghake 2001.

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) hos människor

IPF är en förkortning av den engelska diagnosen idiopathic pulmonary fibrosis. Sjukdomen kallas ibland även cryptogenic fibrosing alveolitis (CFA) eller idiopatisk fibroserande alveolit (IFA). IPF definieras som "en distinkt typ av kronisk fibroserande interstitiell pneumoni av okänd orsak som är begränsad till lungorna och associerad med ett histopatologiskt mönster av UIP i en lungbiopsi" (American Thoracic Society 2002). För att få diagnosen IPF skall även den radiologiska (konventionell röntgen eller CT) samt den kliniska bilden stämma in.

Dessutom ska andra orsaker till lungsjukdomen uteslutas och patienten ska också ha mätbar nedsättning av lungfunktionen. Således kan sägas att alla IPF är UIP, men alla UIP är inte IPF (Costabel & King 2001).

Kliniska symtom vid IPF är dyspné, takypné, knastrande biljud vid inspiration och ibland cyanos (Robbins et al 2005). Bindvävsinlagringen i lungorna gör att compliance minskar och patienten får svårt att öka lungans ventilationsvolym vid behov. Om sekundär hypertension uppkommer i lungkretsloppet blir följden cor pulmonale, vilket kan leda till högersidig hjärtsvikt (Gross & Hunninghake 2001).

Ingen dokumenterat effektiv behandling avseende överlevnad eller livskvalitet finns för IPF-patienter. Trots detta medicinerar de med kortison och azatioprin/cyklofosfamid (Robbins et al 2005). Studier har utförts av olika alternativa terapier så som antifibros-medel (colchicine), penicillamine, interferon- γ , interferon- β , pirfenidone eller antioxidantia (N-acetylcystein) men ingen klinisk effekt har kunnat bevisas (Gross & Hunninghake 2001). För rekommenderat behandlingsschema av human IPF se bilaga 1. Många patienter med IPF drabbas av sekundära komplikationer så som hjärtsjukdomar och infektioner vilka ofta leder till döden (Panos et al 1990). Den genomsnittliga överlevnadstiden från diagnos uppskattas vara mindre än tre år (Gross & Hunninghake 2001). Medelåldern vid diagnos av IPF är 66 år (White et al 2003).

IPF delas vanligen upp i två distinkta undergrupper: spontan och familjär sjukdom. Dessa två grupper har i stora drag samma kliniska bild och behandling, men olika etiologi. Enligt en finsk undersökning uppskattas ca 3 % av alla IPF-fall vara familjära och resterande del av sporadisk typ (Hodgson et al 2002). De två undergrupperna beskrivs närmare nedan.

Familjär sjukdom

Den familjära formen av lungfibros hos människa definieras av en påvisad mutation i den gen som kodar för SP-C (*SFTPC*). Idag finns ett 20-tal kända mutationer varav de allra flesta är koncentrerade till proteinets C-terminala del (Brasch et al 2004, Hamvas et al 2004, Mulugeta et al 2005, Nogee et al 2002, Nogee et al 2001, Stevens et al 2004, Thomas et al 2002). Generellt kan sägas att ju närmare C-terminalen en mutation sitter, desto allvarligare fenotyp (Johnson et al 2005). Endast en mutation har hittats i den sekvens som kodar för det mogna proteinet samt att ingen mutation har hittats i den N-terminala delens sekvens (Nogee 2002). Alla hittills identifierade mutationer i SP-C genen förekommer bara på en allel. Trots att drabbade individer sålunda är heterozygoter för mutationen uppvisar de inget detekterbart SP-C i BAL-vätska, något som inte kunnat förklaras till fullo. En hypotes är att det mutanta proteinet har en dominant negativ effekt på det normala proteinet som produceras, vilket gör att allt SP-C fastnar i cellen med total avsaknad av funktionellt protein som följd (Johnson et al 2005). Immunohistokemisk undersökning av lungvävnad från en patient vilken var heterozygot för en mutation i SP-C genen visade ökad mängd proSP-C i typ II cellerna vilket stöder teorierna om en defekt processning av proprotein (Johansson et al 2004).

Kliniskt och histopatologiskt är det som benämns familjär IPF en mycket heterogen grupp av sjukdomar. Stora variationer finns i graden av respiratoriska symtom, ålder vid sjukdomsdebut samt histologiskt utseende (Nogee et al 2002). Således är inte IPF ett korrekt namn på denna sjukdom enligt ATS vedertagna definition. Den kommer därför fortsättningsvis i texten att refereras till som familjär IIP, vilket är ett mer korrekt uttryck.

Sporadisk sjukdom

Den spontana varianten av lungfibros utgör majoriteten av alla fall av IPF hos människa. Dessa fall, vilka per definition också har ett histopatologiskt mönster av UIP, har inte kunnat associeras med mutationer i SP-C genen hos 89 respektive 25 undersökta patienter (Lawson et al 2004, Markart et al 2007). Kunskapen om vad som orsakar den sporadiska formen av sjukdomen är väldigt begränsad. Låggradiga virusinfektioner och dysreglering av fibroblaster är några teorier (Lungfibroskonferens 2007). Generellt är personer som diagnostiseras med den familjära formen något yngre än de med sporadisk form (Hodgson et al 2002).

Murina sjukdomsmodeller

Vid försök med knock-out möss där SP-C genen slagits ut (SP-C $-/-$) varierade graden av respiratoriska symtom med vilken stam av mus som användes. Möss av utavlad typ (Swiss Black) var till synes friska fram till cirka ett års ålder varpå de utvecklade interstitiell pneumoni liknande den som ses hos människa vid mutationer i *SFTPC* (Whitsett 2002) medan den mer inavlade musstammen 129J fick kraftiga respiratoriska problem med emfysem och fibros redan vid 2-3 månaders ålder (Glasser et al 2003). Bevisligen kan en ren brist på SP-C per se orsaka respiratoriska problem hos möss. Histologiskt kunde ett ökat antal atypiska makrofager med lipidinklusioner ses tillsammans med områden av förtjockade alveolarväggar hos möss av inavlad typ.

Annan forskning har även visat att genmodifierade möss med en viss punktmutation som leder till deletion av exon 4 i proproteinet får en ofullständig lungutveckling vilken mest troligen härrör från en skada på typ II pneumocyter (Bridges et al 2003). Hos människor som är heterozygota för samma mutation har inget SP-C kunnat påvisas i BAL-vätska, vilket kan indikera att vildtypen av proteinet associerar med mutanten och blir kvar i ER. Den effekt som det mutanta proteinet utövar brukar benämnas dominant negativ (Nogee 2004, Wang et al 2003).

Patogenes – möjliga molekylära mekanismer

Hur IPF uppkommer, eller vad det beror på, är som namnet antyder, fortfarande okänt. Det finns dock många teorier vilka är mer eller mindre väl underbyggda. Whitsett och Weaver (2002) föreslår att mutationer i SP-B eller SP-C leder till felprocessning av det mogna proteinet, vilket då ackumuleras intracellulärt och leder till cellstress och skada. Termen aggresomer vilken refererar till aggregat av proteiner i cellen har myntats för att beskriva dessa intracellulära proteinplack (Johnston et al 1998). Att aggregaten inte bryts ned kan bero på proteinplackens

stabilitet som gör att cellen inte klarar av att bryta ned dem med sina proteasomer. En liknande teori föreslår även att felveckat SP-C överskrider cellens nedbrytningspotential för proteiner vilket leder till konstant aktivering av ER-stressorer och påföljande skada av typ II cellerna (Bridges et al 2003). Hela processen med proteinretention innebär också teoretiskt en nedsatt mängd surfaktantprotein i alveolerna, vilket därmed ökar risken för epitelskada genom atelektas. Hypotetiskt skulle proteinaggregat i cellen kombinerat med atelektas kunna utgöra upprepad skada på cellerna vilket leder till fibros. Fibrosen orsakar en expansion av interstitiet vilken försämrar gasutbytet i alveolerna (Norris et al 2005).

Teorier gällande att ren avsaknad av moget SP-C i alveolerna skulle kunna orsaka lungfibros finns också. Den forskning som utförts på knock-out möss stöder i viss mån denna teori (Glasser et al 2003).

Lungfibros hos hund

Interstitiella lungsjukdomar hos hund är väldigt dåligt utredda avseende så väl prevalens, incidens som patologi och etiologi (Corcoran et al 1999). Dock är det ett välkänt faktum att hundar kan drabbas av kroniska interstitiella pneumonier som kan vara orsakade av bland annat infektioner, parasiter eller toxiner (Lobetti et al 2001). Utöver detta finns ett antal fall där man inte kunnat fastställa en orsak till sjukdomen. Merparten av dessa idiopatiska fall har förekommit hos terrierhundar med ett särskilt stort antal av rasen West Highland White Terrier (Westies) (Corcoran et al 1999, Martin 1998). Sjukdomen kallas därför också för "Westie lung disease". Övriga hundraser där fall av lungfibros rapporterats är Jack russell terrier, Cairnterrier (Martin 1998), Staffordshire bullterrier och Schipperke (Lobetti et al 2001).

West Highland White Terrier Club of America publicerade år 2000 en enkätbaserad hälsoundersökning baserad på 2773 hundar, och utifrån djurägarnas svar uppskattades prevalensen av lungfibros till 1,4 %, vilket gör det till den sjunde vanligaste sjukdomen hos Westies. Av de hundar som angavs diagnostiserade med lungfibros var 77,5 % över fem år gamla. Hundägarna ombads också rangordna sjukdomarna efter hur angelägna de kändes för rasen, och då rankades lungfibros som nummer tre efter atopisk dermatit och kranio-mandibulär osteopati (CMO) (Grayson 2000).

Idiopatisk lungfibros hos hund drabbar framför allt medelålders till äldre hundar med en medelålder på 8-9 år (Corcoran et al 1999, Grayson 2000). Den genomsnittliga överlevnadstiden från det att djurägaren börjat se respiratoriska symtom var i en studie 18 månader (Corcoran et al 1999).

Klinisk fenotyp

I en studie av Corcoran et al (1999) beskrivs kronisk lungsjukdom hos 29 hundar av rasen West Highland White Terrier. Den typiska kliniska bilden beskrivs som långsamt progredierande över flera månader med symtom som torrhosta, takypné, dyspné och nedsatt ork. Även cyanos och synkoper förekom i anamnesen för vissa

av dessa patienter. De dominerande fynden vid klinisk undersökning av patienter med lungfibros är knastrande biljud vid inandning och rosslingar (Corcoran et al 1999, Lobetti et al 2001). Blodanalys och klinkemiska parametrar är vanligen helt normala.

På konventionella röntgenbilder kan ett lindrigt till kraftigt ökat interstitiellt till bronkointerstitiellt mönster ses (Corcoran et al 1999), samt i vissa fall även tecken på cor pulmonale, högersidig hjärtförstoring. Cor pulmonale är en rationell följd av det ökade motståndet i lungkretsloppet härrörande från fibrosen, vilken minskar lungans compliance. Orsaker till ett interstitiellt mönster på röntgen kan vara många, t ex lungödem, eosinofil pneumoni och virala infektioner (Myer 1980). De flesta av dessa är möjliga att utesluta genom en grundlig anamnes där tiden för insjuknande är viktig. Lungfibros utvecklas långsamt jämfört med de andra angivna sjukdomarna där symtomen uppkommer snabbt, inom timmar eller dagar (Corcoran et al 1999). Det är extra viktigt att ta bra röntgenbilder när man ska tolka interstitiella förändringar eftersom bilder tagna under expiration, rörelse från djuret eller underexponerade bilder kan ge felaktiga tolkningar (Myer 1980).

De differentialdiagnoser som kvarstår efter en grundlig anamnes och klinisk undersökning är kronisk bronkit, vilket är en vanlig sjukdom hos terrierhundar (Wheeldon et al 1974), lunginflammation av annan orsak eller neoplasi. Anamnesen vid kronisk bronkit är ofta mycket lik den vid lungfibros, en äldre till medelålders hund som under en längre tid haft hosta och varit tröttare än vanligt. Vid kronisk bronkit ses ett förtjockat och oregelbundet epitel i bronkerna samt en ökad slemproduktion, till skillnad från normala bronker som ses hos en hund med lungfibros. Detta gör att bronkoskopi är en lämplig diagnostisk metod (Padrid et al 1990). Tänkvärt vid utredning av dessa hundar är dock att kronisk bronkit ibland förekommer samtidigt med lungfibros (Corcoran et al 1999). Hos en hund av rasen Staffordshire bullterrier har kronisk lungfibros diagnostiserats samtidigt med hypothyreoidism (Corcoran et al 1999).

För att utesluta neoplasi eller andra lunginflammationer kan cytologi av BAL-vätska utföras. Vid lungfibros är BAL-vätskan normal eller med lindrig ökning av inflammatoriska celler (Corcoran et al 1999). Att ställa specifik klinisk diagnos vid interstitiella lungsjukdomar är svårt, och i många fall krävs en lungbiopsi eller obduktion med histopatologisk undersökning av djuret.

Datortomografi

Datortomografi (CT-scanning) som diagnostisk metod vid kroniska lunglidanden har visat sig vara lovande. En studie har utförts på hund där god korrelation mellan lungfibrosens kliniska gravhet och fynden på CT sågs (Johnson et al 2005). I försöket skannades hela thorax med hunden liggandes på bröstet under generell anestesi. För att motverka hypostatisk atelektas blåstes lungan upp genom några andetags manuell ventilation. Hundar med lindrig lungfibros uppvisade bara en lindrigt dimmig förtätning (ground glass appearance) i lungorna, medan de hundar som ansågs vara kraftigt drabbade hade dilaterade bronker (bronkiektasi), tydlig förtjockning av interstitiet samt bikakebildning subpleuralt (fig 4). Hos samtliga undersökta hundar var förändringarna fläckvis utbredda och varvade med

normal lunga. Alla de fynd som tidigare beskrivits vid CT-scanning på människor med IPF kunde identifieras hos hundarna med lungfibros.

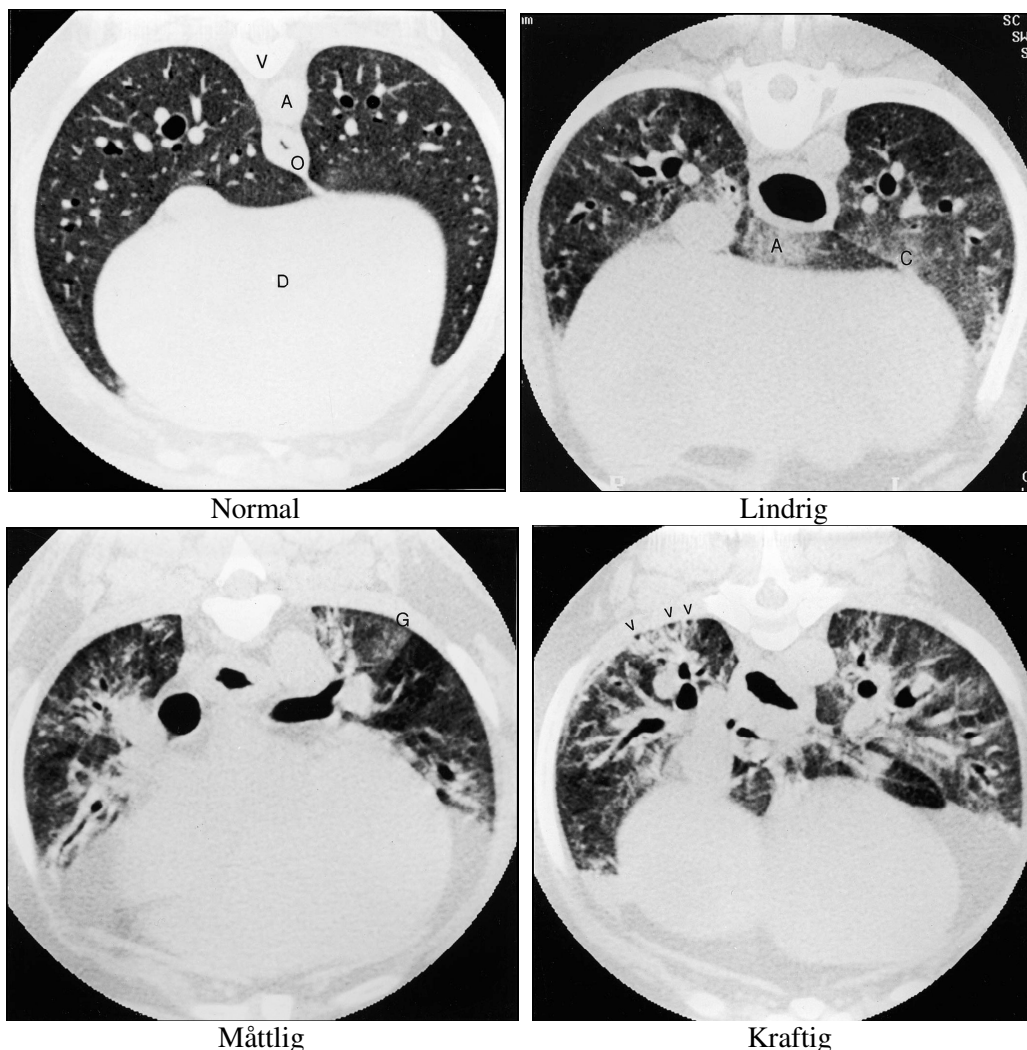


Fig 4. Datortomografi av normal lunga respektive lungor med fibros, olika kraniokaudala plan. Normal lunga: (V) bröstkota, (A) aorta, (O) esofagus (D) lever. Lindrig fibros: en generell ökning i täthet, lungan upplevs som grynig, (A) l. accessorius (C) vänster kaudallob. Måttlig fibros: Ett område med ökad fokalt diffus täthet, ground glass (G), samt mild subpleural och peri-bronkovaskulär interstitiell förtätning. Kraftig fibros: Kraftiga subpleurala samt peribronko-vaskulära förtätningar och ground glass utseende. De små pilhuvudena pekar på bikakemönster. Bilder: Johnson, 2005.

De hundar som diagnostiseras med lungfibros behandlas oftast med glukokortikoider, azatioprin (antiinflammatoriskt) eller cyklofosamid (cellgift) (Corcoran et al 1999). Hundar med lungfibros svarar väldigt olika på denna typ av behandling, och inga studier som jämför behandlingar har utförts.

Histopatologiska kännetecken

De huvudsakliga histopatologiska iakttagelser som gjorts bland de hundar som fått diagnosen idiopatisk lungfibros är sammanfattade i tabell 2.

Tabell 2. Tidigare publicerade histopatologiska fynd vid lungfibros hos hund

Histopatologiska fynd	Referens
Interstitiell fibros	
multifokal	Corcoran et al 1999 Lobetti et al 2001 Norris et al 2005
generell eller diffus	Lobetti et al 2001 Norris et al 2005 Webb & Armstrong 2002
Lindrig till måttlig infiltration av makrofager och lymfocyter	Lobetti et al 2001 Norris et al 2005
Hyperplasi av typ II celler, ofta med ett bisarrt utseende (dysplasi)	Corcoran et al 1999 Lobetti et al 2001 Norris et al 2005
Proteinrik vätska och makrofager med mikrovesikler (fagocyterat material) i alveolerna	Lobetti et al 2001
Lindrig peribronkiolär ökning av glatt muskulatur samt hyperplasi av bronkiolärepitelet	Lobetti et al 2001
Perivaskulär hyalinisering	Lobetti et al 2001

Norris et al (2005) studerade sammansättningen av kollagen I och III i fibrotiska områden och fann att ECM dominerades av typ III kollagen. Typ III kollagen har tidigare visat sig dominera kollagenet hos människor med tidig IPF, medan typ I kollagen tar över i senare stadium av sjukdomen.

Hos en utav hundarna i tidigare publicerade fall hittades även förkalkningar i lungorna i samband med fibrosen (Webb & Armstrong 2002).

MATERIAL OCH METODER

Mellan 2002 och 2006 samlades fem fall med diagnosen lungfibros in. Hundarna hade alla symtom på andnöd (dyspné/takypné), nedsatt ork och biljud vid andning. Diagnosen ställdes kliniskt med röntgen och uteslutande av andra orsaker samt senare med histopatologi.

Fem hundar av olika raser med annan lungsjukdom eller utan respiratoriska symtom samlades in för att användas som kontroller för surfaktantanalys. En 7 år gammal Norwich Terrier med arteriell lungtrombos, en 13 årig Tibetansk spaniel med kronisk mitralisinsufficiens och lungödem samt en Rhodesian Ridgeback (13 år), en Labrador retriever (10 år) och en West Highland White Terrier (13 år).

Blodprover samlades in från tre friska hundar av olika raser för att användas som kontroll vid sekvensering av SP-C genen. Hundarna var av terrier-blandras, schäfer och whippet.

Etiskt tillstånd finns för alla provtagningar och analyser utförda på hundar ingående i fallstudien.

Patologi

Fullständig obduktion med histopatologi utfördes på de fem hundarna med klinisk diagnos av lungfibros samt de fem kontrollerna för surfaktantanalys. Vävnadsprov från lungan fixerades i 10 % buffrad formalin, bäddades in i paraffin och snittades. Snitten färgades sedan med hematoxylin-eosin (HE) och van Gieson samt i vissa fall Masson's Trichrome, Periodic Acid Schiff (PAS) färgning och Sudan IV (fettfärgning).

Bronkoalveoärt lavage (BAL)

Ett postmortalt BAL-prov kunde samlas på tre hundar (A, B och E) genom att instillera 100-300 ml steril koksaltlösning via endotrakealtub inom ett dygn efter avlivning av djuret. Provet hölls sedan upp på 50 ml rör och centrifugerades långsamt (200g) varpå eventuella celler avlägsnades med pelleten. Ingen cytologi utfördes på dessa BAL-prover eftersom risken för postmortala förändringar inte kunde uteslutas.

Western Blot

BAL-vätskan koncentrerades genom centrifugering 15,800 xg i 2 timmar vid 4 °C varpå supernatanten sögs av och pelleten löstes i 0,05M Tris pH 7 med hjälp av ultraljudssonikering i en timme. För att applicera en standardiserad mängd fosfolipider och därmed surfaktant i varje brunn på gelen för Western Blot bestämdes mängden fosfor (µg/ml) i de olika BAL-vätskorna med hjälp utav 70 % perklorosyra jäsning enligt Mrsny et al (1986).

Lika stor mängd fosfolipider (50 µg) applicerades i varje brunn och SDS-PAGE utfördes på en 16,5 % akrylamid gel med Tris/Tricine som buffertsystem. Proteinerna överfördes sedan med hjälp av elektroblottning till ett PVDF-membran med 20mM Tris/150mM Glycin/0,05 % SDS/20 % metanol under strömstyrkan 0,8mA/cm². Efter transfer av proteinerna blockerades membranet 1 h i 5 % fettfri torrmjölk och tvättades därefter 10 min i 0,1 % PBS-Tween och 3x 10 min i PBS. Immunodetektion av SP-C utfördes genom inkubering med polyklonala kaninantikroppar mot rekombinant SP-C (Altana AG, Konstanz, Tyskland) som späddes 1:100. För att detektera SP-B användes en kaninantikropp riktad mot humant SP-B som korsreagerar med SP-B från alla djurslag i en spädning av 1:15 000 (gåva från professor Timothy E. Weaver, Cincinnati, USA). Membranet inkuberades sedan med anti-kanin horseradish peroxidase-konjugerade antikroppar () i en spädning av 1:5000. Ett kemiluminiscens kit användes sedan för att visualisera SP-B och SP-C banden på en ljuskänslig film.

Sekvensering av proSP-C genen

Ett blodprov i EDTA-rör togs från 2 st av hundarna med lungfibros före avlivning samt 4 kontroller. Blodproven analyserades antingen direkt eller förvarades i -20 °C till analys utfördes. DNA preparerades fram genom ett kommersiellt tillgängligt DNA extraktions kit (QIAGEN, VWR International, Stockholm). SP-C genen (ca 3kB) amplifierades med hjälp av en primer uppströms från exon 1 och en reverse primer nedströms från exon 5. För en förteckning över samtliga primers se bilaga 2. PCR-produkten analyserades med hjälp av en 0,6 % agarosgel och extraherades sedan med ett gel-renings kit (QIAGEN).

Den amplifierade SP-C genen användes som templat för sekvenserings PCR med Big Dye Sequencing kit (ABI prism). Fem olika primers användes för sekvensering, de två ovan nämnda samt ytterligare tre (se bilaga 2). De primers som användes valdes inom en intronsekvens bredvid närliggande exon. Två primers användes på exon 3 för att utesluta en polymorfism. Sekvensen erhöles med sekvenseringsapparaten 310 Genetic Analyser (ABI prism).

RESULTAT

Anamnes och klinisk presentation

Fall A

12 år gammal tik av rasen Tibetansk terrier som inkom till kliniken med misstänkt pyometra. Hunden var sedan tidigare diagnostiserad med trolig lungfibros enligt djurägaren, inga journaler finns på detta. Ägaren upplevde vid besöket på kliniken att hunden var mer tungandad än vanligt, samt att den hade ont i magen och drack hela tiden. Hundens allmäntillstånd var mycket dämpat samt att den hade feber (40,2 °C), flytningar från vulva, juvertumörer, takypné (RR=34/min), takykardi (HR=108 slag/min) och kraftigt förstärkta andningsljud. Röntgen bekräftade misstanke om pyometra samt att en förstorad lever sågs (hepatomegali). Röntgenbilder av thorax visade ett ökat bronko-interstitiellt mönster. Ägaren valde att avliva hunden.

Fall B

Kastrerad tik av rasen West Highland White Terrier som sökte för respirationsproblem första gången vid nio års ålder. Blev då diagnostiserad med kronisk interstitiell fibros efter thoraxröntgen och ett EKG utan påvisbara förändringar. Sattes på behandling med prednisolon (7 dagar med nedtrappning), Synulox (amoxicillin med klavulansyra) samt Mollipect (bromhexin och efedrin). Vid återbesök två veckor senare hade hunden fortfarande takypné (RR=40/min) och knastrande ljud vid inandning. Medicinering med prednisolon samt Mollipect (vid behov) fortsattes.

Hunden kommer tillbaka till kliniken ca 14 dagar senare och ägaren upplever nu att hon förutom flåsigheten har nedsatt ork och torrhosta vid ansträngning. Vid undersökning konstateras att biljuden vid andning förvärrats. Blodprover tas vilket inte förändrar diagnosen (hematologi, syra/bas, BE, pO₂, Ca²⁺, trombocyter).

Ungefär tre år senare återkommer patienten till kliniken då hennes allmäntillstånd försämrats över senaste månaderna. Står då på hög dos prednisolon (5 mg var 48:e

timme). Tydliga biljud vid andning (knaster) samt kraftig hosta. Har även en uttalad generell pyodermi. Djurägaren bestämmer sig för att avliva hunden.

Fall C

Kastrerad West Highland White Terrier hona som vid 9 års ålder diagnostiserats med eosinofil bronkit. Djurägaren beskrev vid denna första kontakt att hunden hade andningsproblem vid ansträngning och la sig ned och flåsade efter en kortare stunds lek. Vid auskultation av lungorna hördes fräsande biljud vid in- och utandning. Medicinerad med prednisolon och Bricanyl (terbutalin) varpå hunden blev lite piggare. Stod på Keflex sedan tidigare mot hudproblem. Hunden kommer därefter in akut cirka ett och ett halvt år senare med respiratoriska problem efter att ha blivit påkörd. Ägaren uppger då att hunden även innan traumat var tungandad hemma och ibland andades med öppen mun. Röntgen visar ett interstitiellt mönster och hunden sätts på prednisolon. Ett dygn senare sätts furix in. Den röntgas därefter två dagar senare utan större förändring. Den radiologiska diagnosen föreslås vara neurologiskt eller annat icke-kardiogent lungödem. Hunden avlivas i samråd med djurägaren.

Fall D

10 år gammal West Highland White Terrier hane som fistelopererats pga urinsten och då upplevdes som något tungandad. Söker till kliniken två år senare eftersom hunden är blå i slemhinnorna, slö, inte vill gå ut, är vinglig och hässjar kraftigt. De kliniska fynden var cyanotiska slemhinnor, takykardi och takypné (<120 per min), kraftigt förstärkta andningsljud och vinglighet. På röntgen sågs ett generellt måttligt ökat interstitiellt mönster med en trolig förstoring av höger hjärthalva. Ny bild togs efter giva av furix, utan förändringar. Lungfibros föreslogs som radiologisk diagnos. Ultraljud av hjärtat utfördes och ingen högersidig hjärtförstoring sågs, ej heller några andra signifikanta fynd. Lindrig hyperkinesi av hjärtat, ingen regurgitation kunde ses. Hunden placerades i syrgasbur och andningsfrekvensen sjunker något. Blodprov för hematologi är utan anmärkning, endast en lindrig ej signifikant monocytos. Hunden skrivs in och behandlas med prednisolon, men blir sämre och beslut om avlivning tas tillsammans med djurägaren.

Fall E

West Highland White Terrier tik, 11 år som söker till kliniken för problem med hosta, nedsatt ork och trötthet. En större panel av blodprover tas med lever- och njurvärden, hematologi samt Ca. Inga onormala fynd på blodprovet. Röntgen av thorax visar på ett interstitiellt och delvis bronkiellt mönster samt misstanke om lindrig högersidig hjärtförstoring (cor pulmonale). Problemen akutiseras efter ungefär ett år och patienten kommer då till kliniken med grav dyspné, takypné (RR>60/min) samt hostar hela tiden. Kraftiga knastrande biljud bilateralt vid andning. Hunden avlivas i samråd med djurägaren.

Histopatologiska fynd

Inga av de fem kontrollhundarna som användes för surfaktantanalys uppvisade några tecken på lungfibros histopatologiskt. Hos samtliga hundar med lungfibros

ses kronisk interstitiell pneumoni. Nedan följer mer utförlig histopatologisk beskrivning av fallen (A-E) samt en morfologisk diagnos. För bilder se figur 5.

Fall A

Multifokalt ses områden med måttlig till kraftig diffus interstitiell fibros samt måttlig hyperplasi av typ II pneumocyter. Typ II pneumocyterna är ställvis dysplastiska med onormal form och förekomst av två kärnor. Vissa delar av lungan uppvisar ett nästan normalt utseende med endast en lindrig ökning av antalet alveolarmakrofager. Flerkärniga alveolarmakrofager förekommer. Den inflammatoriska bilden domineras av mononukleära celler med huvudsakligen lymfocyter och makrofager i interstitiet. Multifokalt ses måttlig förekomst av neutrofiler, troligen på grund utav en tillstötande sekundär akut purulent pneumoni.

Bronker och bronkioler samt blodkärl utan anmärkning.

Diagnos: Kronisk interstitiell pneumoni med sekundär akut purulent pneumoni

Fall B

Frekvent förekommande områden med kraftig diffus fibros i interstitiet. Fibrosen är mest utbredd i diafragmaloberna. Multifokalt ses hyperplasi av typ II pneumocyter. Rikligt med makrofager innehållande mikrovesikler i cytoplasman ses i alveoli, samt måttligt med mononukleära celler ffa lymfocyter i interstitiet. Flertalet större cystor beklädda med typ II pneumocyter omgivna av bindväv. I flertalet alveoler sågs ett homogent PAS-positivt material. Bronker och bronkioler samt blodkärl utan anmärkning.

Diagnos: Kronisk interstitiell pneumoni med PAS-positivt material i alveolerna.

Fall C

Diffus interstitiell fibros med få områden med normal lungvävnad. Rikligt med fagocyterande makrofager i alveoli och intersitium. Områden med lindrig hyperplasi av typ II celler. I flertalet alveoler sågs ett homogent PAS-positivt material. Måttligt med förkalkningar i lungparenkymet. Lungan ger generellt ett tätt intryck på grund utav den diffusa fibrosen samt ett komplicerande icke-kardiogent lungödem.

Diagnos: Kronisk interstitiell pneumoni med PAS-positivt material i alveolerna samt akut lungödem.

Fall D

Multifokal diffus interstitiell fibros av alveolarsepta. Lindrig hyperplasi av typ II celler. Fokala ansamlingar av makrofager med lipidhaltigt innehåll (Sudan IV). Dessutom konstaterades vid obduktion en hypertrofi och dilatation av höger kammare (cor pulmonale).

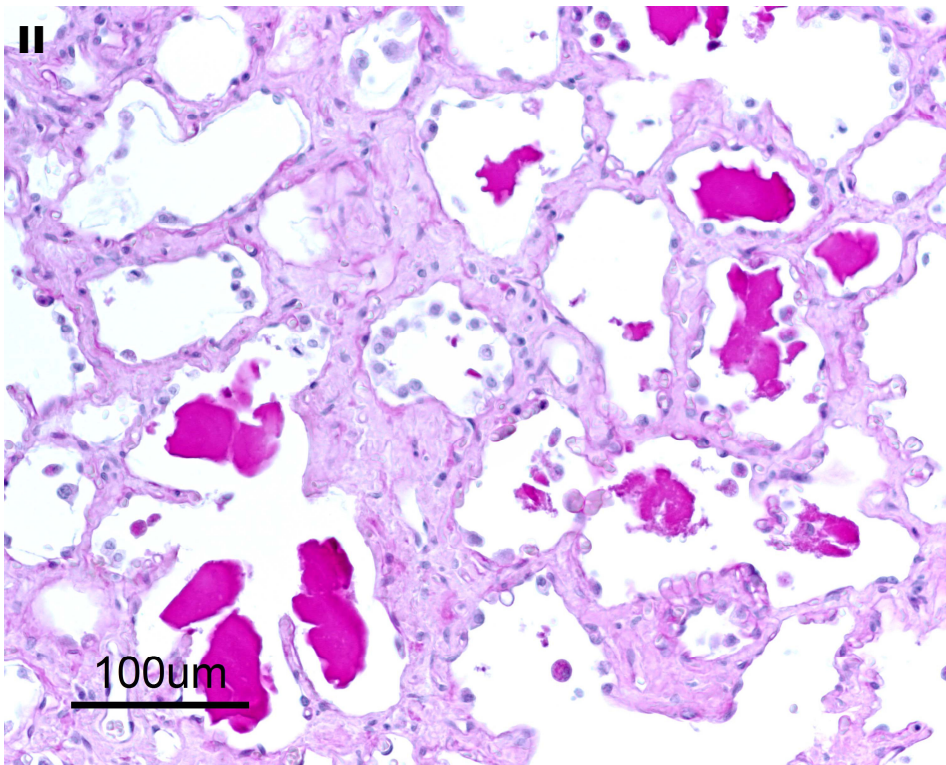
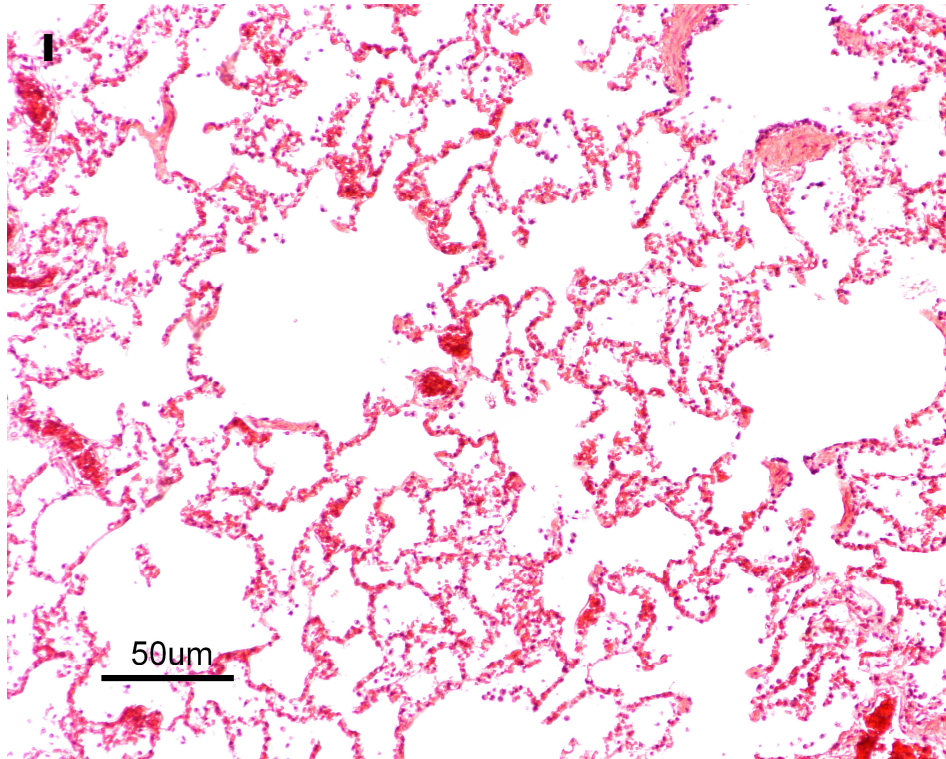
Diagnos: Kronisk interstitiell pneumoni

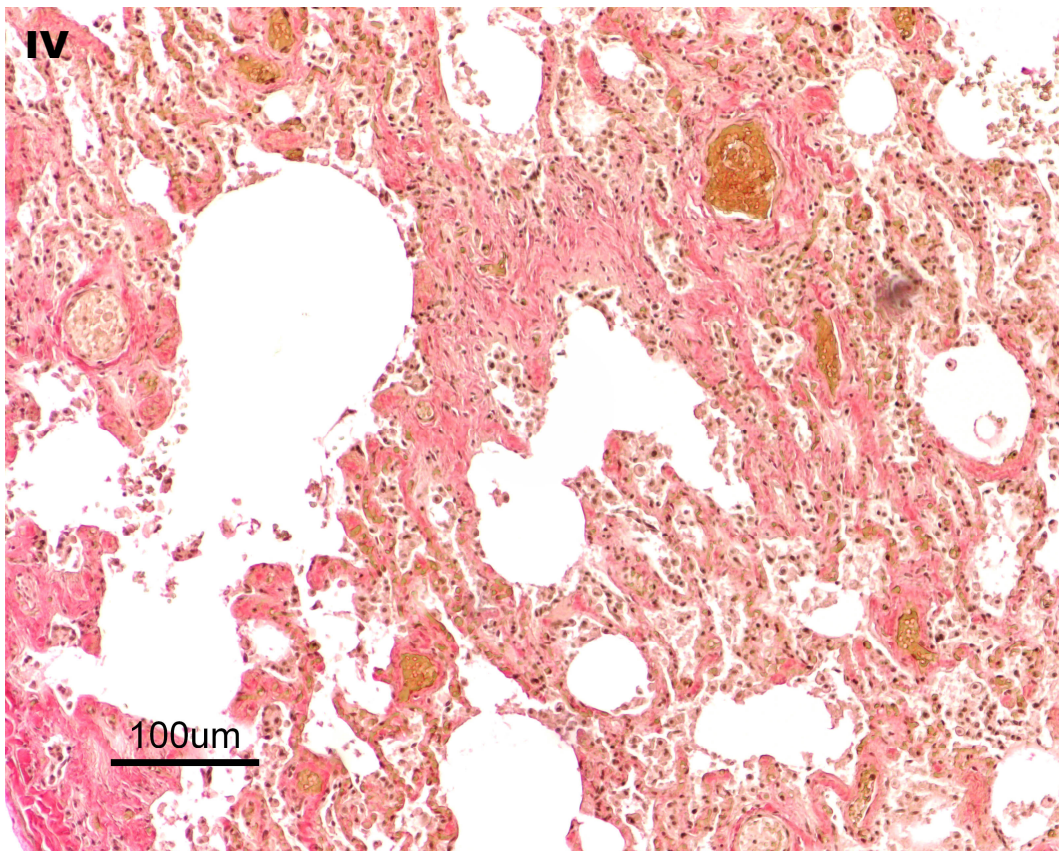
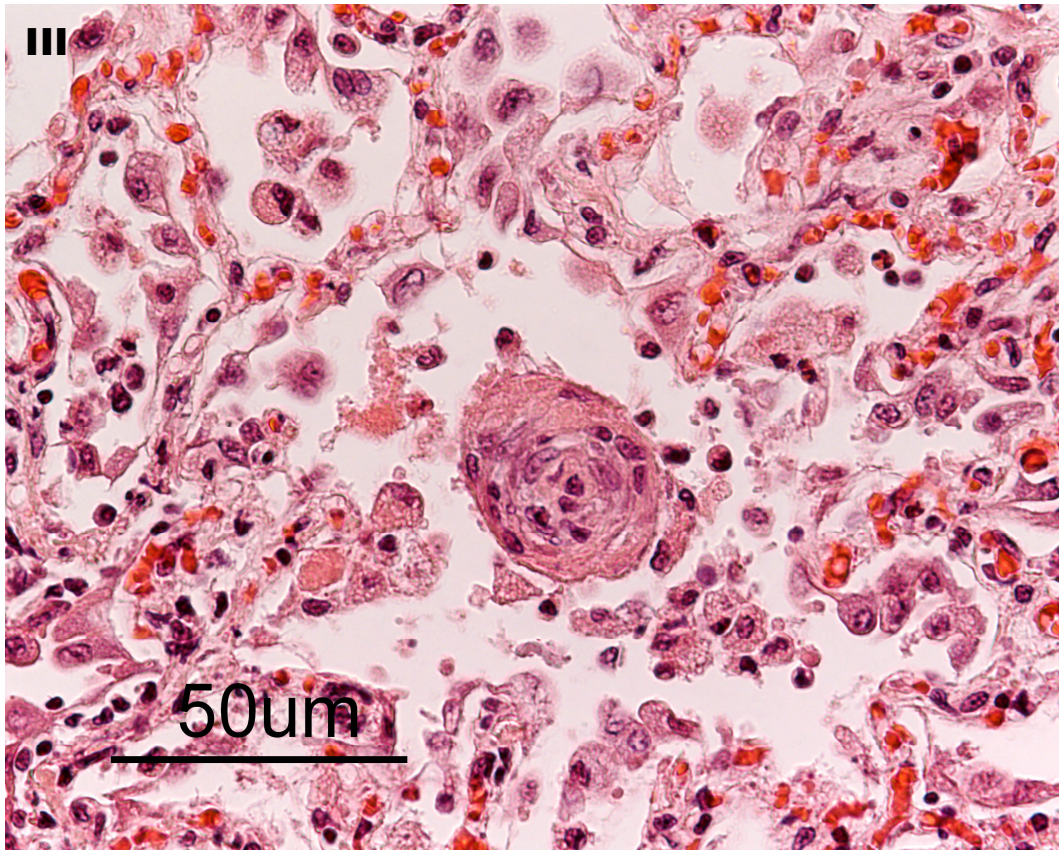
Fall E

Multifokal diffus interstitiell fibros vilken var mest uttalad i diafragmaloberna. Rikligt med utspridda fibroblast-foci. Kraftig hyperplasi av typ II celler med epitelisering vilket ger lungan ett körtelliknande intryck. Riklig förekomst av jätteceller och makrofager i interstitiet och alveolerna. Måttlig mängd

mononukleära celler i interstitiet, huvudsakligen lymfocyter. Dessutom konstaterades vid obduktion en hypertrofi och dilatation av höger kammare (cor pulmonale).

Diagnos: Kronisk interstitiell pneumoni





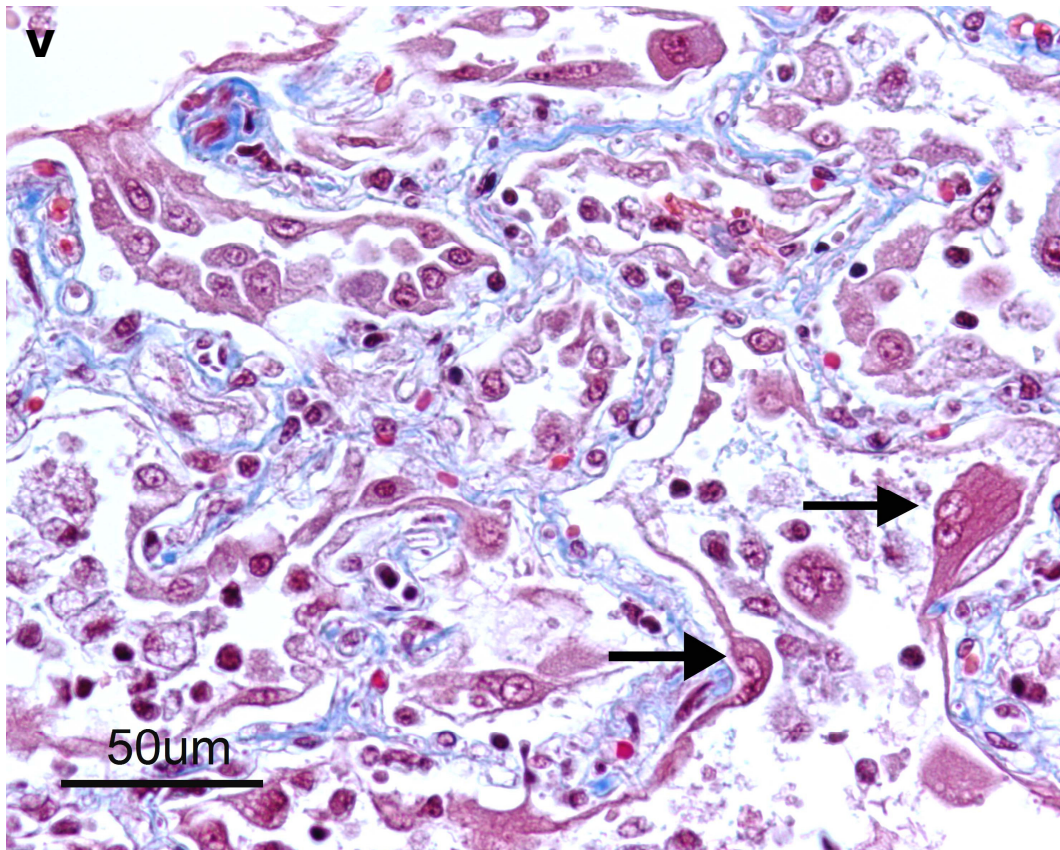


Fig 5 I-V. Histologiska bilder av fall. I. Normal lunga (HE) II. Fall B, lunga (PAS). Interstitiell fibros, hyperplasi av typ II celler och PAS-positivt homogent material i alveoli. III. Fall E, lunga (HE). Centralt ses ett fibroblast focus. Förekomst av skummiga alveolarmakrofager i alveoli. IV. Fall D, lunga (van Gieson). Uttalad interstitiell fibros med förekomst av cystliknande hålrum. V. Fall E, lunga (Masson's trichrome). Uttalad hyperplasi av typ II celler med förekomst av dysplastiska celler (pilar) samt interstitiell fibros.

Western blot och surfaktantanalys

Inget SP-C kunde detekteras i BAL-vätska hos en av hundarna som diagnostiserats med lungfibros, fall A, markerad med * i figuren (fig 6). Hos alla de övriga hundarna, inklusive de två andra med lungfibros, kunde SP-C däremot påvisas.

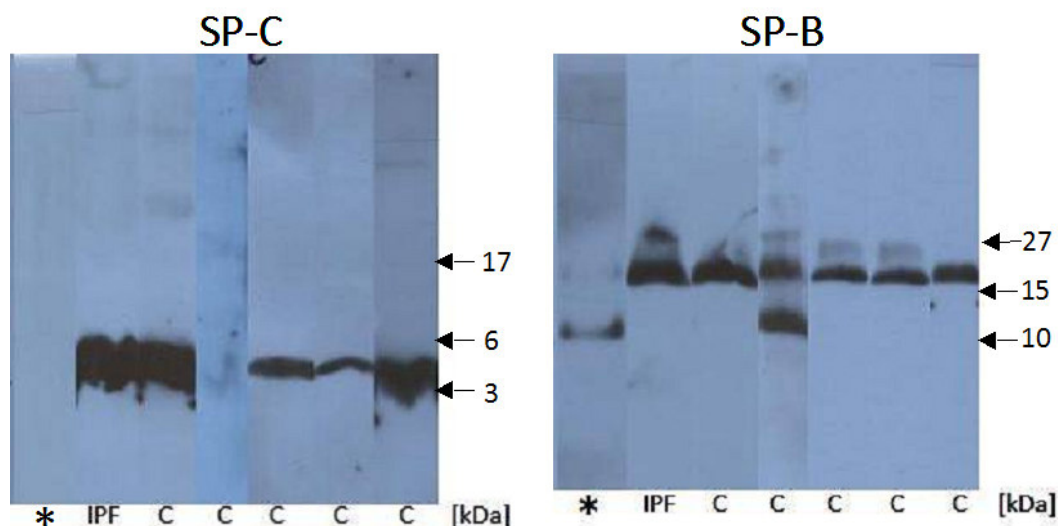


Fig 6. Western Blot för påvisande av SP-C (ca 4 kDa) och SP-B. SP-B kan förekomma som monomer (ca 9 kDa) eller dimer (ca 17 kDa). Hos en av hundarna med diagnosen lungfibros kunde inget SP-C detekteras (*), däremot sågs SP-B i samma prov. I figuren är endast två av hundarna med lungfibros representerade.

Vid sekvensering av proSP-C genens exoner kunde inga mutationer påvisas hos de två hundar som diagnostiserats med lungfibros, inte heller hos några av kontrollhundarna. Däremot sågs ett antal polymorfismer (se bilaga 2).

DISKUSSION

Prevalensen av lungfibros hos West Highland White Terrier på 1,4 % är inte uppseendeväckande hög, men ändå är sjukdomen ett stort orosmoment för hundägare. Att lungfibros väcker stort engagemang är egentligen inte konstigt med tanke på att det är en dödlig sjukdom som inte har någon väl fungerande behandling och ingen känd orsak som kan elimineras i förebyggande syfte. De likheter och skillnader som finns med human IPF gör dessutom hundarna till en intressant och naturlig modell för sjukdomen. Hundar är generellt en exceptionellt bra modell för humana sjukdomar eftersom de lever i liknande miljöer som människor och ändå har en relativt liten genetisk variation inom raserna.

Avsaknaden av detekterbart SP-C i BAL-vätska från en av hundarna med lungfibros är en intressant iakttagelse i samstämmighet med det man tidigare sett hos människor med en familjär form av lungfibros. Familjär lungfibros har, som tidigare beskrivits, kopplats till mutationer i SP-C genen. Avsaknaden av påvisbart protein i alveolerna kan bero på att inget moget protein når alveoli eller att det av någon teknisk anledning inte kan detekteras. En reell avsaknad av detekterbart SP-C skulle kunna bero på att inget SP-C secerneras till alveoli, eller att det har en annan konformation eller aggregeringsgrad vilken antikroppen inte känner igen. En ofullständig klyvning av C-terminalen skulle teoretiskt kunna orsaka ett protein av onormal storlek med förändrad epitop. Man kan också tänka sig att proteinet fastnar i typ II cellens organeller eller i aggresomer. Denna teori är förmodligen den mest realistiska samt den teori om patogenes som just nu är mest väl förankrad på humansidan. En ökad mängd proSP-C i typ II pneumocyter

har dessutom kunnat påvisas med hjälp utav immunohistokemi hos en individ med en punktmutation i SP-C genen (Whitsett & Weaver 2002). Preliminära försök med immunohistokemi av proSP-C i fall A har utförts, men på grund av ospecifika reaktioner med antikroppen går dessa resultat inte att tolka. Screening för proSP-C är annars en naturlig fortsättning vid utforskande av etiologin bakom lungfibros.

Ingen har tidigare publicerat resultat av analyser utförda på surfaktantproteiner i BAL-vätska hos hundar. Metoden är känslig och svår att utföra vilket bland annat beror på den relativt stora mängden fosfolipider och proteiner i BAL-vätskan. En stor mängd övriga molekyler är att förvänta av biologiska prover, men beror troligen också till viss del på förändringar i samband med avlivning och normala postmortal förändringar. Tidigare studier på kalvar har dock visat att mängden surfaktantproteiner i BAL-vätska är oförändrad inom 24 timmar post mortem (Danlois et al 2000) vilket betyder att en mildare kadaverös förändring inte ger nedbrytning av SP-B eller SP-C. Det är dock önskvärt att BAL-sköljningen utförs så nära avlivningstillfället som möjligt då kontamination av hemoglobin och proteiner från lyserade celler försvårar analyserna vid applikation av proverna för Western Blot.

SP-C sågs hos alla kontrollhundar, även de med andra lungsjukdomar. Det är således inte troligt att kronisk lungsjukdom i sig leder till att SP-C inte kan detekteras i BAL-vätska. SP-C kunde påvisas hos en äldre West Highland White Terrier utan tecken på lungfibros, vilket gör det osannolikt att det skulle vara en brist som finns hos alla äldre hundar av denna ras.

Det finns välgrundad anledning att tro att lungfibros hos Westies har en ärftlig komponent, med tanke på den relativt höga sjukdomsprevalensen i rasen jämfört med andra hundraser. Tidigare publicerade undersökningar av hundar med lungfibros stöder också detta (Corcoran et al 1999, Martin 1998). Därför förefaller det naturligt att vidare undersöka en eventuell genetisk komponent för att se om mutationer i genen som kodar för proSP-C även förekommer hos hundar med lungfibros. Trots att inga mutationer identifierades i de fem exonerna som sekvenserades i denna studie utesluter detta inte en genetisk komponent i sjukdomsmönstret. Materialet är för litet för att dra några slutsatser från, samt att mutationer i intronsekvenser eller enzymer som deltar i processningen av proSP-C är möjliga. Dessa delar av genomet är inte sekvenserade i detta arbete. Däremot finns det ingenting som tyder på att någon av dessa fem hundar skulle ha mutationer liknande de som identifierats hos människor med lungfibros till dags dato.

Troligen är lungfibros hos hund inte bara en enda genetiskt betingad sjukdom, utan slutstadiet av en mängd olika patologiska processer. En felaktig veckning eller avsaknad av SP-C är sannolikt inte hela sanningen bakom sjukdomen men kan kanske förklara en del fall. Endast 3 % av alla IPF-fall är orsakade av en mutation i SP-C genen (Hodgson 2002), och det vore teoretiskt tänkbart att förhållandet hos hundar är liknande. Ovanstående resonemang skulle hypotetiskt kunna förklara varför SP-C saknas hos endast en hund utav tre. Det vore orimligt att tro att alla hundar med lungfibros skulle ha en mutation i SP-C genen. Att vi

dessutom ser liknande sjukdomar hos andra hundar, samt även katter och hästar kan härröra från lungans begränsade förmåga till svar på skadliga stimuli.

För att få klassa en idiopatisk interstitiell pneumoni som IPF på humansidan måste den uppvisa ett histopatologiskt mönster karakteristiskt för UIP (Costabel & King 2001). Histopatologin för samtliga ingående fem hundar med lungfibros visar tydliga tecken på ökad mängd bindväv i interstitiet. Lokalisationen av förändringarna är däremot inte subpleural, vilket beskrivits hos människor med UIP. Bindvävens utbredning hos ingående hundar är diffus och däremot möjligen något mer uttalad kaudalt mot diafragmaloberna. Kraftiga öar av fibros vilket skapar cystliknande hålrum liknande de som beskrivits hos människa sågs även hos en två av dessa hundar. Detta liknar det fynd som humanpatologerna definierar som bikakebildning och som sed vid UIP. Hos en utav hundarna sågs också tydliga foci av fibroblaster av samma typ som de som tidigare publicerats i samband UIP på människa. Däremot går det inte att uttala sig angående förekomst av myofibroblaster i dessa foci eftersom färgningar för muskelproteiner inte utförts på dessa fem fall. Immunohistokemi med myofibroblastspecifika antikroppar på dessa snitt vore en intressant fortsatt väg att gå.

Förkalkningar i lungan parallellt med fibros sågs hos en hund av fem, vilket även tidigare rapporterats hos en hund med lungfibros (Webb & Armstrong 2002). Dessa förkalkningar skulle också kunna vara en förändring som orsakats av en kronisk membranös glomerulonefrit vilket också hittades hos denna hund vid obduktion (McGavin & Zachary 2006).

Den inflammation som sågs i lungan hos de ingående fem hundarna var generellt av lindrig till måttlig karaktär. De många makrofagerna med mikroväsikler skulle kunna tyda på att homeostasen av surfaktant är rubbad. Förändringen skulle kunna bero på en minskad katabolism eller en ökad anabol verksamhet, något som påminner om en upplagringsjukdom. Om sjukdomen berodde på en ospecifik kronisk inflammation som orsakar fibros så borde tidig antiinflammatorisk terapi vara verksamt. Så är lång ifrån fallet och det är därför enligt min mening mera rimligt att söka svaret i någon annan mekanism.

Hyperplasi av typ II celler är en uttalad förändring hos både hundar och människor med IPF. Alla de fem studerade fallen har mer eller mindre uttalad hyperplasi av typ II pneumocyter. Hos två av fallen sågs även dysplastiska typ II celler med onormal form och ibland förekomst av flera kärnor. En ökad proliferation av dessa celler tyder på regeneration av lungans epitel vilket indikerar en pågående skadlig process i alveolerna.

Norris et al (2005) studerade sammansättningen av kollagen I och III i fibrotiska områden och fann att extracellulär matrix där dominerades av typ III kollagen. Typ III kollagen har tidigare visat sig dominera kollagenet hos människor med tidigt stadium av IPF medan typ I kollagen tar över i senare i sjukdomen (Kuhn et al 1989, Raghu et al 1985). Detta är en intressant skillnad mellan arterna. Är den lungfibros vi ser hos Westies ett tidigt stadium av lungfibros eller är det olika sjukdomar som har liknande fenotyp? Att lungfibros hos hund skulle diagnostiseras i ett tidigare stadium än hos människor känns inte så troligt eftersom hundarna ofta visar kraftiga symtom under en längre period. Om

hundarna kunde tala skulle de kanske redan tidigare i sjukdomsförloppet kunnat berätta att de hade svårt att andas. Jag anser därför att det rimligen borde vara tvärt om, att hundarnas lungfibros är en mycket mer långt gången variant av lungfibros. Immunohistokemi för olika typer av kollagen hos de här fem fallen är inte utförd, men skulle vara intressant i framtida studier.

Det förefaller lämpligt att den sjukdom hos hund som histologiskt karaktäriseras av interstitiell fibros med hyperplasi av typ II pneumocyter, mild inflammation samt uppvisar tidigare beskrivna kliniska fynd ska benämnas *lungfibros* eller *canine pulmonary fibrosis (CPF)* och inte IPF. Detta i samstämmighet med World Wide Conference on Canine Idiopathic Pulmonary Fibrosis samt för att markera att sjukdomen skiljer sig något från IPF som beskrivits hos människa.

Många kliniska likheter finns med den i arbetet beskrivna sjukdomen hos hund och IPF hos människa. Den kliniska bilden av lungfibros är även väldigt samstämmig mellan de fem hundar som undersöktes i fallserien. Det behöver däremot inte vara enkelt att skilja ut dessa hundar från andra med till exempel bronkit eller hjärtsvikt eftersom symtomen är diffusa. En noggrann undersökningsgång med blodprov, röntgen samt eventuellt ultraljud och bronkoskopi är essentiellt. Att ta diagnostiska röntgenbilder vid maximal inspiration kan vara svårt eftersom hundarna har respiratoriska problem (takypné/dyspné). Det är därför viktigt att vara medveten om bildens kvalitet vid tolkning, samt att noggrant väga in kliniska fynd i en eventuell diagnos. Vartefter CT blir billigare och mer tillgängligt för veterinärer är det också ett utmärkt diagnostiskt verktyg. Hundens ras kan dessutom ge veterinären en bra ledtråd eftersom lungfibros nästan uteslutande drabbar Westies eller andra hundar av terrierras. Sjukdomen kan ibland vara svår att upptäcka även för ägaren, som tror att nedsatt ork och ökad trötthet är en normal del av hundens åldrande.

Vid diagnostiserad sjukdom är understödjande behandling det enda man idag kan göra för hunden. För att få djuret att vara så symptomfritt som möjligt kan kortison, hostdämpande eller bronkodilatorer ges. Mer avancerade scheman för behandling kan eventuellt adopteras från humansidan. Även enklare åtgärder som förhöjer livskvaliteten för hunden bör sättas in. Det kan till exempel vara minskad fysisk aktivitet, skydd från stress av andra husdjur eller viktminskning.

Kunskapen om lungfibros hos människa är begränsad, ändå är den oändligt många gånger större än det vi vet om sjukdomen hos våra hundar. Genom att belysa likheter och skillnader mellan arterna kan veterinära forskare dra nytta av humanmedicinens kunskap för diagnostik och terapi av fibroshundar. Kanske kan också människans bästa vän fungera som modell för sjukdomen, ett samarbete som kommer både hundar och människor tillgodo. Sett ur en komparativ aspekt kan även skillnader i sjukdomarna mellan arterna bidra till ökad kunskap. Jag anser att det definitivt är betydelsefullt att fortsätta samla in material från hundar med misstänkt lungfibros för att få fler väldokumenterade kliniska och histopatologiska fall.

LITTERATURFÖRTECKNING

- American Thoracic Society (2002) American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. This joint statement of the American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS) was adopted by the ATS board of directors, June 2001 and by the ERS Executive Committee, June 2001. *Am J Respir Crit Care Med* 165, 277-304
- Beers, M. F. & Mulugeta, S. (2005) Surfactant protein C biosynthesis and its emerging role in conformational lung disease. *Annu Rev Physiol* 67, 663-696
- Brasch, F., Griese, M., Tredano, M., Johnen, G., Ochs, M., Rieger, C., Mulugeta, S., Müller, K. M., Bahuau, M. & Beers, M. F. (2004) Interstitial lung disease in a baby with a de novo mutation in the SFTPC gene. *Eur Respir J* 24, 30-39
- Bridges, J. P., Wert, S. E., Nogee, L. M. & Weaver, T. E. (2003) Expression of a human surfactant protein C mutation associated with interstitial lung disease disrupts lung development in transgenic mice. *J Biol Chem* 278, 52739-52746
- Caswell, J. L. & Williams, K. J. (2007) Respiratory system. In: Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of domestic animals, 5th edn. Ed M. G. Maxie. Elsevier Saunders, Edinburgh ; New York. pp 523-653
- Cohn, L. A., Norris, C. R., Hawkins, E. C., Dye, J. A., Johnson, C. A. & Williams, K. J. (2004) Identification and characterization of an idiopathic pulmonary fibrosis-like condition in cats. *J Vet Intern Med* 18, 632-641
- Corcoran, B. M., Cobb, M., Martin, M. W., Dukes-McEwan, J., French, A., Fuentes, V. L., Boswood, A. & Rhind, S. (1999) Chronic pulmonary disease in West Highland white terriers. *Vet Rec* 144, 611-616
- Costabel, U. & King, T. E. (2001) International consensus statement on idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* 17, 163-167
- Coultas, D. B., Zumwalt, R. E., Black, W. C. & Sobonya, R. E. (1994) The epidemiology of interstitial lung diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 150, 967-972
- Danlois, F., Zaltash, S., Johansson, J., Robertson, B., Haagsman, H. P., van Eijk, M., Beers, M. F., Rollin, F., Ruysschaert, J. M. & Vandenbussche, G. (2000) Very low surfactant protein C contents in newborn Belgian White and Blue calves with respiratory distress syndrome. *Biochem J* 351, 779-787
- Dobson, C. M. (2001) The structural basis of protein folding and its links with human disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356, 133-145
- Glasser, S. W., Detmer, E. A., Ikegami, M., Na, C. L., Stahlman, M. T. & Whitsett, J. A. (2003) Pneumonitis and emphysema in sp-C gene targeted mice. *J Biol Chem* 278, 14291-14298
- Grayson, J. K. (2000) West Highland White Terrier Health Survey Final Report. Health Committee of the West Highland White Terrier Club of America
- Gross, T. J. & Hunninghake, G. W. (2001) Idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 345, 517-525
- Gustafsson, M., Thyberg, J., Näslund, J., Eliasson, E. & Johansson, J. (1999) Amyloid fibril formation by pulmonary surfactant protein C. *FEBS Letters* 464, 138-142
- Hamvas, A., Nogee, L. M., Mallory Jr, G. B., Spray, T. L., Huddleston, C. B., August, A., Dehner, L. P., delMello, D. E., Moxley, M., Nelson, R., Cole, S. & Colten, H. R. (1997) Lung transplantation for treatment of infants with surfactant protein B deficiency. *The Journal of Pediatrics* 130, 231-239
- Hamvas, A., Nogee, L. M., White, F. V., Schneider, P., Hackett, B. P., Huddleston, C. B., Mendeloff, E. N., Hsu, F.-F., Wert, S. E., Gonzales, L. W., Beers, M. F. & Ballard, P. L. (2004) Progressive lung disease and surfactant dysfunction with a deletion in surfactant protein C gene. *Am J Respir Cell Mol Biol* 30, 771-776
- Hodgson, U., Laitinen, T. & Tukiainen, P. (2002) Nationwide prevalence of sporadic and familial idiopathic pulmonary fibrosis: evidence of founder effect among multiplex families in Finland. *Thorax* 57, 338-342

- Johansson, J., Persson, P., Löwenadler, B., Robertson, B., Jörnvall, H. & Curstedt, T. (1991) Canine hydrophobic surfactant polypeptide SP-C. A lipopeptide with one thioester-linked palmitoyl group. *FEBS Letters* 281, 119-122
- Johansson, J., Weaver, T. E. & Tjernberg, L. O. (2004) Proteolytic generation and aggregation of peptides from transmembrane regions: lung surfactant protein C and amyloid beta-peptide. *Cell Mol Life Sci* 61, 326-335
- Johnson, V. S., Corcoran, B. M., Wotton, P. R., Schwarz, T. & Sullivan, M. (2005) Thoracic high-resolution computed tomographic findings in dogs with canine idiopathic pulmonary fibrosis. *J Small Anim Pract* 46, 381-388
- Johnston, J. A., Ward, C. L. & Kopito, R. R. (1998) Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J Cell Biol* 143, 1883-1898
- Kuhn, C. I., Boldt, J., King, T. E., Crouch, E., Vartio, T. & McDonald, J. (1989) An immunohistochemical study of architectural remodeling and connective tissue synthesis in pulmonary fibrosis. *Am Rev Respir Dis* 140, 1693-1703
- Lawson, W. E., Grant, S. W., Ambrosini, V., Womble, K. E., Dawson, E. P., Lane, K. B., Markin, C., Renzoni, E., Lympany, P., Thomas, A. Q., Roldan, J., Scott, T. A., Blackwell, T. S., Phillips, J. A., 3rd, Loyd, J. E. & du Bois, R. M. (2004) Genetic mutations in surfactant protein C are a rare cause of sporadic cases of IPF. *Thorax* 59, 977-980
- Lobetti, R. G., Milner, R. & Lane, E. (2001) Chronic idiopathic pulmonary fibrosis in five dogs. *J Am Anim Hosp Assoc* 37, 119-127
- Lungfibroskonferens (2007) Worldwide Conference on Canine Idiopathic Pulmonary Fibrosis, Lafayette, IN, USA. p Konferens för inbjudna med syfte att främja forskning inom området lungfibros hos hund.
- Markart, P., Ruppert, C., Wygrecka, M., Schmidt, R., Korfei, M., Harbach, H., Theruvath, I., Pison, U., Seeger, W., Guenther, A. & Witt, H. (2007) Surfactant protein C mutations in sporadic forms of idiopathic interstitial pneumonias. *Eur Respir J* 29, 134-137
- Martin, M. W. S. (1998) Progressive lung disease with pulmonary crackles in 18 terrier breed dogs. Paper synopses, Proceedings of the British Small Veterinary Association Congress 1998. p 287
- McGavin, M. D. & Zachary, J. F. (2006) Pathologic basis of veterinary disease, 4. edn. Mosby Elsevier, St. Louis, Mo. p 1476
- Mrsny, R. J., Volwerk, J. J. & Griffith, O. H. (1986) A simplified procedure for lipid phosphorus analysis shows that digestion rates vary with phospholipid structure. *Chem Phys Lipids* 39, 185-191
- Mulugeta, S., Nguyen, V., Russo, S. J., Muniswamy, M. & Beers, M. F. (2005) A surfactant protein C precursor protein BRICHOS domain mutation causes endoplasmic reticulum stress, proteasome dysfunction, and caspase 3 activation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 32, 521-530
- Myer, W. (1980) Radiography review: the interstitial pattern of pulmonary disease. *Veterinary Radiology* 21, 18-23
- Nogee, L. M. (2002) Abnormal expression of surfactant protein C and lung disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 26, 641-644
- Nogee, L. M. (2004) Alterations in SP-B and SP-C expression in neonatal lung disease. *Annu Rev Physiol* 66, 601-623
- Nogee, L. M., Dunbar, A. E., 3rd, Wert, S., Askin, F., Hamvas, A. & Whitsett, J. A. (2002) Mutations in the surfactant protein C gene associated with interstitial lung disease. *Chest* 121, 20S-21S
- Nogee, L. M., Dunbar, A. E., Wert, S. E., Askin, F., Hamvas, A. & Whitsett, J. A. (2001) A mutation in the surfactant protein C gene associated with familial interstitial lung disease. *The New England Journal of Medicine* 344, 573-578
- Norris, A. J., Naydan, D. K. & Wilson, D. W. (2005) Interstitial lung disease in West Highland White Terriers. *Vet Pathol* 42, 35-41

- Olson, A. L., Swigris, J. J., Lezotte, D. C., Norris, J. M., Wilson, C. G. & Brown, K. K. (2007) Mortality from pulmonary fibrosis increased in the United States from 1992 to 2003. *Am J Respir Crit Care Med* 176, 277-284
- Padrid, P. A., Hornof, W. J., Kurpershoek, C. J. & Cross, C. E. (1990) Canine chronic bronchitis. A pathophysiologic evaluation of 18 cases. *J Vet Intern Med* 4, 172-180
- Palmblad, M. (2001) Structural and functional properties of hydrophobic surfactant-protein analogues. In: Department of Surgical Science section for Clinical Chemistry and Blood Coagulation and Department of Medical Biochemistry and Biophysics. Karolinska Institutet, Stockholm. p 40
- Palmblad, M., Johansson, J., Robertson, B. & Curstedt, T. (1999) Biophysical activity of an artificial surfactant containing an analogue of surfactant protein (SP)-C and native SP-B. *Biochem J* 339, 381-386
- Panos, R. J., Mortenson, R. L., Niccoli, S. A. & King, T. E., Jr. (1990) Clinical deterioration in patients with idiopathic pulmonary fibrosis: causes and assessment. *Am J Med* 88, 396-404
- Raghu, G., Striker, L., Hudson, L. & Striker, G. (1985) Extracellular matrix in normal and fibrotic human lungs. *Am Rev Respir Dis* 131, 281-289
- Robbins, S. L., Abbas, A. K., Kumar, V., Fausto, N. & Cotran, R. S. (2005) Diffuse interstitial (infiltrative, restrictive) diseases. In: Robbins and Cotran pathologic basis of disease, 7th edn. Elsevier Saunders, Philadelphia, Pa. pp 728-732
- Sköld, M. (2007) Lungfibros (Idiopatisk fibroserande alveolit). www.internetmedicin.se, Stockholm
- Socialstyrelsen (2007) Dödsorsaker 2004. Socialstyrelsen, Stockholm. p 236
- Stevens, P. A., Pettenazzo, A., Brasch, F., Mulugeta, S., Baritussio, A., Ochs, M., Morrison, L., Russo, S. J. & Beers, M. F. (2004) Nonspecific interstitial pneumonia, alveolar proteinosis, and abnormal proprotein trafficking resulting from a spontaneous mutation in the surfactant protein C gene. *Pediatric Research* 57, 89-98
- Thomas, A. Q., Lane, K., Phillips, J., 3rd, Prince, M., Markin, C., Speer, M., Schwartz, D. A., Gaddipati, R., Marney, A., Johnson, J., Roberts, R., Haines, J., Stahlman, M. & Loyd, J. E. (2002) Heterozygosity for a surfactant protein C gene mutation associated with usual interstitial pneumonitis and cellular nonspecific interstitial pneumonitis in one kindred. *Am J Respir Crit Care Med* 165, 1322-1328
- Wang, W. J., Mulugeta, S., Russo, S. J. & Beers, M. F. (2003) Deletion of exon 4 from human surfactant protein C results in aggresome formation and generation of a dominant negative. *J Cell Sci* 116, 683-692
- Webb, J. A. & Armstrong, J. (2002) Chronic idiopathic pulmonary fibrosis in a West Highland white terrier. *Can Vet J* 43, 703-705
- Wheeldon, E. B., Pirie, H. M., Fisher, E. W. & Lee, R. (1974) Chronic bronchitis in the dog. *Vet Rec* 94, 466-471
- White, E. S., Lazar, M. H. & Thannickal, V. J. (2003) Pathogenetic mechanisms in usual interstitial pneumonia/idiopathic pulmonary fibrosis. *J Pathol* 201, 343-354
- Whitsett, J. A. (2002) Genetic basis of familial interstitial lung disease: misfolding or function of surfactant protein C? *Am J Respir Crit Care Med* 165, 1201-1202
- Whitsett, J. A. & Weaver, T. E. (2002) Hydrophobic surfactant proteins in lung function and disease. *N Engl J Med* 347, 2141-2148
- Williams, K., Malarkey, D., Cohn, L., Patrick, D., Dye, J. & Toews, G. (2004) Identification of spontaneous feline idiopathic pulmonary fibrosis: morphology and ultrastructural evidence for a type II pneumocyte defect. *Chest* 125, 2278-2288

TACK -- ACKNOWLEDGEMENT

Tack till mina trevliga handledare Janne, Henrik, Elisabet och Jens som lagt ned massor av tid och engagemang under flera år, och för att ni gav mig chansen att åka till Indianapolis på IPF-konferens. Tack till Kerstin och Hanna för många roliga stunder, hjälp med försöken och för att ni lärt mig labba. Tack mamma och pappa för de underbara förutsättningar och ovillkorliga stöd jag alltid fått. Sist men inte minst vill jag tacka de djurägare som låtit sina bästa vänner hjälpa oss med ökad kunskap inom området, ni är ovärderliga!

Bilaga 1.

Tabell med rekommenderad medicinsk behandling för humanpatienter med diagnosen idiopatisk lungfibros (IPF). Direkt översatt från Costabel & King 2001.

Kortikosteroider (prednisolon eller likvärdigt)

0,5 mg/kg lean body weight (LBW) per dag per os i 4 veckor

0,25 mg/kg och dag i 8 veckor

Trappa ned till 0,125 mg/kg och dag eller 0,25 mg/kg varannan dag

plus

Azatioprin

2-3 mg/kg LBW per dag

Maximal dos är 150 mg dagligen

Dosering påbörjas med 25-50 mg/dag, öka dosen med 25 mg varje till varannan vecka till maxdosen är uppnådd.

eller

Cyklofosfamid

2 mg/kg LBW per dag

Maximal dos är 150 mg dagligen

Dosering påbörjas med 25-50 mg/dag, öka dosen med 25 mg varje till varannan vecka till maxdosen är uppnådd.

Lean Body Weight (LBW) = kroppens vikt utan fett.

<http://www.uihealthcare.com/topics/sportsmedicine/spor5117.html>

Bilaga 2.

Förteckning över primers använda för analys av SP-C genen hos hund

Amplifiering av hela genen (ca 3kB):

uppströms från exon 1: 5'-tgtcccctctccctaccggc-3'

nedströms från exon 5: 5'-gggttccccagttccgggtc-3'

Sekvensning av exonerna:

Exon 1: 5'-tgtcccctctccctaccggc-3'

Exon 2: 5'-agggtgccccgcttgtgcag-3'

Exon 3: 5'-aagagggctgagggtggagg-3'

Exon 4: 5'-actctccgggtgcctagcc-3'

Exon 5: 5'-atgaagtacacagctctgt-3' (reverse)

Polymorfismer i proSP-C genen hos hund:

Fall ID	<i>Genetiska polymorfismer SP-C gen, exon 5</i>
A	b. 12 (G>C) b. 78 (T>C)
B	b. 78 (T>C)
kontroll	b. 12 (G>C)